

**Cytopathischer Effekt
und Plaque-Morphologie verschiedener
Herpes-Simplex-Virusstämme**

Dieter Donner

=

1962

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL

CYTOPATHISCHER EFFEKT
UND PLAQUE-MORPHOLOGIE
VERSCHIEDENER HERPES-SIMPLEX-VIRUSSTÄMME

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dieter Donner

aus

Leipzig



München 1962

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL

Dekan: Prof. Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1962

CYTOPATHISCHER EFFEKT UND PLAQUE-MORPHOLOGIE

VERSCHIEDENER HERPES-SIMPLEX-VIRUSSTÄMME

Für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten in seinem Hause sei es mir gestattet, dem Direktor der II. Medizinischen Universitätsklinik in München, Herrn Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL, an dieser Stelle zu danken.

Für die Anregung zum Thema der vorliegenden Arbeit und die umfangreiche Unterstützung in jeder Hinsicht bei ihrer Durchführung sei Herrn Privatdozent Dr. med. Klaus MUNK, Direktor des Instituts für Virusforschung in Heidelberg, in Anerkennung und Verbundenheit gedankt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555208_0034

INHALTSÜBERSICHT

EINFÜHRUNG	1
METHODIK	3
EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	7
A. Virusdarstellung	7
Herkunft der untersuchten Stämme	7
Methode der Herpesvirus-Isolierung und -Darstellung	7
B. Cytopathischer Effekt auf der HeLa-Kultur	10
1. CPE-Formen	10
2. Biologische Bedingungen der Syncytienbildung	12
3. Untersuchungen über die Entstehungs- weise der Syncytien	15
C. Anwendung der Plaque-Technik auf das System Herpesvirus - HeLa-Zelle	19
1. Vorversuche	19
2. Plaque-Technik	26
D. Plaque-Morphologie der untersuchten Herpes-Stämme	27
DISKUSSION	32
ZUSAMMENFASSUNG	43
LITERATUR	45

Bei der Anzüchtung des Herpes-simplex-Virus auf Gewebekulturen eines HeLa-Zellen-Dauerstammes war die Bildung von Riesenzellen oder Syncytien als besonderes Merkmal der cytopathischen Veränderungen aufgefallen und diskutiert worden (MUNK, 28). Weitere Untersuchungen mit zwei bekannten Herpes-Virusstämmen hatten ergeben, daß der eine Stamm, 'Armstrong', die Bildung mehrkerniger Riesenzellen auslöste, während der cytopathogene Effekt des anderen Stammes, 'Zacchari', lediglich in einem Abrunden und Ablösen der infizierten Zellen von der Glaswand des Kulturgefäßes bestand. Diese Beobachtung regte dazu an, weitere, von Patienten frisch isolierte Herpes-Virusstämmen in ihrem cytopathogenen Verhalten auf der Gewebekultur zu untersuchen. Hierzu sollte zunächst das übliche Gewebekulturverfahren unter Verwendung eines Dauerstammes von HeLa-Zellen herangezogen und ferner die Methode nach DULBECCO und VOGT (11, 12) angewendet werden, bei der die Zellkultur unter starrem, agarhaltigem Medium gehalten wird.

Ein unterschiedliches cytopathogenes Verhalten auf der Gewebekultur war für das Herpes-simplex-Virus schon vor einiger Zeit durch McNAIR-SCOTT et al. (35) beobachtet worden. Diese Autoren hatten verschiedene Typen des cytopathischen Effektes beschrieben. Sie werden später eingehend vergleichend diskutiert, da unsere Beobachtungen über die dort gegebene Einteilung im einzelnen noch hinausgehen. Weitere Versuche einer Typeneinteilung für das Herpesvirus waren von CHU und WARREN (5) sowie ROIZMAN und SCHNEWEIS (31, 34) unternommen worden. Sie erbrachten jedoch weder einheitliche biologische noch serologische Ergebnisse.

Für den quantitativen Teil unserer Arbeit fehlte uns zunächst eine einfache und brauchbare Titrationsmethode für das Herpesvirus. Herkömmliche Verfahren zur Bestimmung des Infektionstiters von Agentien, die das Herpesvirus enthalten, bieten sich in der Beimpfung der Chorionallantoismembran (CAM) embryonierter Hühnereier, wie sie NADEJE (30) angegeben hat, und in Titrationen nach Art der Plaque-Technik, wie sie sich zuerst von DULBECCO für Erreger der Enterovirengruppe (Polioviren) vorgeschlagen findet. Abwandlungen dieses Verfahrens brachte KAPLAN (23; vgl. auch SCHERER und SYVERTON, 33; BLACK und MELNICK, 4; STOKER, 37) auf das System Herpes-simplex-Virus - Kaninchennierenzelle

in Anwendung. FARNHAM (14) endlich benutzte für das System Herpesvirus - HeLa-Zelle die Gewebedauerkultur unter flüssigem Nährmedium zu Titrationszwecken.

Mühseligkeit des Verfahrens und Unsicherheit in der Reproduzierbarkeit derart gewonnener Titrationsergebnisse beeinträchtigen den Wert dieses Vorgehens schwer. Wir kamen deshalb zu einer Modifikation des ursprünglichen Verfahrens von DULBECCO und VOGT. Es gelang, die erheblichen Schwierigkeiten zu überwinden, auf die FARNHAM gestoßen war: die lange Latenzperiode des Herpesvirus, die langsame Plaqueausbreitung und die Eigenheit herpesinfizierter Zellen, noch im infizierten Zustand Vitalfarbstoff in gleichem Maße aufzunehmen wie nicht infizierte Zellen.

Da die Plaque-Methode nach DULBECCO unter Verwendung von HeLa-Zellen beim Herpesvirus noch nicht beschrieben wurde, hatte diese Arbeit schließlich zum Ziele, das an der HeLa-Gewebekultur beobachtete unterschiedliche cytopathogene Verhalten der Herpesstämmen auch unter den Bedingungen dieses Verfahrens an der gleichen Zellart zu untersuchen. Dabei sollte geprüft werden, ob sich auf Grund der Plaque-Morphologie auch beim Virus des Herpes simplex eine Typeneinteilung ableiten ließe, wie sie für andere Virusarten beschrieben worden ist (HSIUNG und MELNICK, 21).

Bei der Zielsetzung für unsere Arbeit hatten wir also folgende Punkte zu berücksichtigen:

(1) Im Hinblick auf die schon länger bekannten Differenzen im Bilde des cytopathischen Effektes (CPE), wie er von verschiedenen Herpes-simplex-Virusstämmen auf HeLa-Zellkulturen produziert wird, war eine Reihe von Stämmen verschiedener Herkunft auf Besonderheiten und Gemeinsamkeiten ihres cytopathogenen Verhaltens mit dem Gedanken an eine mögliche Typeneinteilung zu untersuchen.

(2) In Sicherheit und Einfachheit überzeugende Titrationsmethoden nach Art der Plaque-Technik waren mit dem Herpesvirus auf HeLa-Zellen bisher nicht angegeben worden.

(3) Bei keiner der bisher beschriebenen Beobachtungen wurden stammes-kennzeichnende Eigentümlichkeiten in der Plaque-Morphologie verschiedener Herpesstämmen vermerkt.

METHODIK

1. Zellkulturen

Die Anzüchtung und die Passagen der Herpes-Virusstämme erfolgten in Gewebekulturen unter Verwendung eines Dauerstammes der HeLa-Zelle (GEY, 17; GEY, COFFMAN und KUBICEK, 18). Die Kulturen wurden in Vierkant-Gewebekulturflaschen (Schott & Gen.) unter Gummistopfenverschluß angelegt und in dem unten angeführten Medium bei 37°C gehalten.

Das Fortzüchten und Verbreitern der Gewebekulturen erfolgte nach der Methode von MELNICK und OPTON (27): zum Zweck der Neuaussaat wurden die Zellen unter Verwendung von Natriumversenatlösung von der Gefäßwand gelöst, die entstandene Suspension zentrifugierten wir vorsichtig bei 600 rpm, nahmen das Sediment in neuem Nährmedium auf und verbrachten es in Gewebekulturflaschen. Die Verbreiterung der Gewebekultur entsprach dem Verhältnis 1 : 3. Bei wiederholter Fütterung mit frischem Medium hatten sich die Kulturen nach durchschnittlich sechs Tagen zu dichten Rasen geschlossen.

Für die Untersuchung gefärbter cytologischer Präparate wurden die Zellen auf Objektträgern angezüchtet, die sich beim Anlegen der Kulturen am Boden der Kulturgefäße befanden. Die Beschickung mit Zellen und die weitere Behandlung erfolgten wie üblich.

Für die Durchführung der Plaque-Tests wurde unter den bisher angegebenen Methoden die nach MELNICK unter Verwendung geschlossener Kulturflaschen ausgewählt. Dabei erübrigen sich Feuchtigkeitssättigung und Durchströmen des Brutschrankes mit CO₂-Luftgemisch, wie sie die Benutzung von Petrischalen bei den Verfahren von DULBECCO und YOUNGNER (43) erforderlich macht. Außerdem wurde Wert auf die Möglichkeit gelegt, das Milieu im Kulturmedium verändern zu können, was nur in verschlossenen Gefäßen zu erreichen ist.

Als Kulturgefäße für die Anlegung der Plaque-Kulturen wählten wir sog. Steilbrust-Pulverflaschen (Schott & Gen.) mit einem Bodendurchmesser von 5 cm, die mit Gummistopfen fest verschließbar sind. Sie bieten folgende Vorteile:

Man benötigt nur bescheidene Zellmengen; der Boden der Flaschen ist flach und annähernd planparallel, was eine gleichmäßige Agarschichtung und gu-

te Beobachtungsmöglichkeiten gewährt; die Flaschenwand trifft den Flaschenboden im rechten Winkel - die Agarschicht bekommt den nötigen Halt und ist nicht durch Abrutschen gefährdet; diese Pulverflaschen besitzen eine weite Öffnung, die das sorgfältige Reinigen erleichtert. In der üblichen Weise wurden versenierte Zellen zur Neuaussaat bereitet und in diesen Gefäßen angezüchtet. Bei einer Einstellung der Zellkonzentration auf etwa $1 \cdot 10^6 \text{ml}^{-1}$ zum Zeitpunkt der Aussaat durfte nach 24 bis 48 Std. Inkubation mit voll ausgewachsenen, den Gefäßboden gleichmäßig überziehenden, lückenlos geschlossenen Zellrasen gerechnet werden. Nur in diesem einwandfreien Zustand wurden die Kulturen in den Versuch genommen.

2. Medium

Als flüssiges Nährmedium für die Fütterung der Stammkulturen wie zur Anzucht der Versuchskulturen wurde die von MELNICK und OPTON angegebene Lösung verwendet:

in HANKSscher Lösung wurden

0,5 g% Lactalbumin-Hydrolysat (Nutrit. Biochem. Corp.),

0,075 g% NaHCO_3 und die

Antibiotica Penicillin (100 IE/ml),

Streptomycin (1 mg/ml),

Moronal (50 - 100 Einh./ml) gelöst sowie

5 bzw. 10% sterilfiltriertes Kälberserum zugesetzt.

Variationen der Mediumzusammensetzung werden an Ort und Stelle bei den einzelnen Versuchen angegeben.

3. Versenlösung (Natriumversenat nach MELNICK und OPTON) benutzen wir zur Lösung ausgewachsener Zellrasen zum Zwecke der Neuaussaat.

4. Phosphatgepufferte Salzlösung nach DULBECCO wurde zum Waschen der Zellkulturen und zur pH-Einstellung vor ihrer Beimpfung sowie für die Herstellung von Virusverdünnungen verwendet.

5. Nähragar

Bei der Zubereitung des agarhaltigen Nährmediums für die Plaque-Kultur folgten wir mit Abweichungen YOUNGNER: HANKSsche Lösung (ohne den

Indikator Phenolrot angesetzt) erhielt Zusätze von:

- 0,90 g% Agar (Difco),
- 0,138 g% Hefeextrakt (Difco),
- 0,10 g% Lactalbumin-Hydrolysat,
- 0,150 g% NaHCO_3 und
- 10,0 % Kälberserum, außerdem

Antibiotica in den oben angeführten Konzentrationen.

Sollte der Agar der Vitalfärbung dienen, so enthielt er ferner Neutralrot in einer Konzentration von 0,1 mg/ml.

6. NaHCO_3 -Stammlösungen, die den Medien in Konzentrationen von 0,0375, 0,075 bzw. 0,150 g% zugesetzt werden konnten.

7. Die Färbung der cytologischen Präparate erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin, Fixierung nach ROMEIS.

8. Calciumfrei angesetzte HANKSsche Lösung und calciumfrei dialysiertes Kälberserum.

9. Immunserum

Für die Gewinnung von Antiseren des Stammes Armstrong wurden junge Mäuse mit HeLa-passiertem Antigen (0,02 ml) intracerebral geimpft. Nach ihrem Verenden homogenisierten wir die durch Sektion gewonnenen Hirne mit DULBECCO-Puffer und wiederholten die Mäusepassage. Das anschließend an diese zweite Passage aufgearbeitete Hirnmaterial wurde einer größeren Anzahl weißer Mäuse aus Inzuchtstämmen intraperitoneal injiziert bei achttägigem Abstand der sechsfach wiederholten Injektionen und Aufstieg der Antigenkonzentrationen von 10^{-5} bis 10^0 (entsprechend $2 \cdot 10^5$ pfu/ml für das unverdünnte Material). Von den überlebenden Tieren gewannen wir das Serum durch Entbluten, Zentrifugieren bei 3000 rpm, Inaktivierung und abschließende Ultrazentrifugierung bei 15000 rpm. Die Prüfung der Wirksamkeit und Bestimmung des Antikörpertiters erfolgten im Plaque-Reduktions-Test (Tab. 1).

Immunserum- verdünnung in Puffer	1 : 32	1 : 64	Antigen- kontrollen
	0	9	78
	2	7	81
	1	8	75

(Titerangaben in pfu je Flasche)

Tab. 1: Plaque-Reduktionstest:

Zur Ermittlung des Antikörpergehaltes des Mäuse-Immunserums wurde Antigen des Virusstammes Armstrong mit dem gleichen Volumen einer Verdünnung des homologen Serums zur Reaktion gebracht und das Gemisch anschließend im Plaque-Verfahren verimpft.

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

A. VIRUSDARSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden 12 Stämme des Herpes-simplex-Virus (*Herpesvirus hominis*; *Scelus recurrens* spec.nov.) untersucht. Sie finden sich in Tab. 2 zusammengefaßt.

Herkunft der untersuchten Virusstämme

- a) Zwei Stämme, Armstrong 1116 und Zacchardi, sind in den USA isoliert und bereits in der Literatur beschrieben worden (ARMSTRONG, 1; GAJDUSECK et al., 16).
- b) Sechs Stämme: Bergauer, Hofmeister, Stadelmann, Wohlenberg, H₅, H₆, wurden in der Dermatologischen Universitätsklinik München, Dr. NASEMANN, zunächst auf CAM isoliert und später auf HeLa-Zellen weitergeführt.
- c) Vier Stämme: Gartner, MK, Seyffert, Ulbrich, wurden im eigenen Laboratorium auf die folgende Weise isoliert:

Methode der Herpesvirus-Isolierung und -Darstellung

Die im eigenen Laboratorium durchgeführten Herpesvirus-Isolierungen erfolgten auf der HeLa-Zellkultur. Bei der Isolierung der Stämme MK, Seyffert, Ulbrich, bei denen es sich um rezidivierende Herpes-labialis-Bläschen handelte, wurde der Inhalt frischer Effloreszenzen mit einer dünnen PASTEURschen Kapillare entnommen, mit Nährmedium (Serumgehalt 5%) vermischt und auf die HeLa-Kultur gebracht.

Die Isolierung des Stammes Gartner gelang aus Mundspülwasser (physiologische Kochsalzlösung, phosphatgepuffert) bei einem Patienten mit Stomatitis aphthosa. Zur genauen Identifizierung wurde dieser Stamm zwischen zwei Gewebekulturpassagen einer Passage auf der CAM befruchteter, bebrüteter Hühnereier unterworfen. Dabei zeigte er die für das Herpesvirus typischen Pocken auf der CAM.

Bei allen Erstanzüchtungen auf der HeLa-Kultur unter antibioticahaltiger Nährflüssigkeit wurde nach 24 Std. das Medium gewechselt. Für den Fall, daß bei der Erstanzüchtung trotz Antibioticaschutzes eine mikrobielle Nebeninfektion auftrat, wurde die virushaltige Kulturflüssigkeit zwischen den wei-

teren Passagen durch bakteriendichte Glasfilter (Schott G5) filtriert.

Sobald sich in den beimpften Kulturen ein vollständiger CPE feststellen ließ, wurde das virus- und zellhaltige Medium entnommen, bei 20 000 rpm unter Beobachtung guter Kühlung des Mischbechers homogenisiert und endlich kurz bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand bildete die Virussuspension, den niedergeschlagenen Zelldetritus verwarfen wir. Auf diese Weise gelang es, durch Freisetzung des intrazellulären Virus den Infektionstiter des Agens um zwei Zehnerpotenzen gegenüber der ausschließlichen Verwendung des bei Inkubationsende frei im Medium suspendierten extrazellulären Virus zu erhöhen.

Im einzelnen verfahren wir bei den weiteren Passagen so, daß die Zellkulturen nach Entfernung des alten Mediums mit Impfflüssigkeit beschickt wurden, bis gerade der gesamte Zellrasen davon bedeckt war. Nach einer Adsorptionsperiode von 4 Std. bei 37°C entfernten wir das Inoculum und füllten frisches Nährmedium auf. Die weitere Inkubation erfolgte bei 32°C. Diese Daten hatten sich als günstig für eine maximale Virusausbeute erwiesen: die Penetration des Virus durch die Zellwand ist stark temperaturabhängig und optimal bei 37°C, die Konkurrenz der thermischen Inaktivierung mit der Produktion des Virus legt die spätere Herabsetzung der Temperatur für die Dauer der weiteren Inkubation auf 32°C nahe (FARNHAM und NEWTON, 15; THOMPSON und COATES, 39; WHEELER, 41). Allgemein betrug die Inkubationsdauer zwischen 48 und 72 Std.

Stammes- bezeichnung	Herkunft	Lokalisation	Während der Unter- suchung durchlau- fene Passagen auf HeLa-Zellkulturen
1. Armstrong 1116	Dr. ARMSTRONG 1943 (Lit. 1)	CNS	28. - 53. Passage
2. Zacchardi	Dr. GAJDUSECK 1952 (Lit. 16)	Herpetic gin- givostomatitis	1. - 11. Passage
3. Bergauer	Dermatolog. Klinik	Herpes perianalis	5. - 26. Passage
4. Hofmeister	Dermatolog. Klinik	Herpes genitalis (intraurethralis)	5. - 24. Passage
5. Stadelmann	Dermatolog. Klinik	Ekcema herpeticat.	3. - 8. Passage
6. Wohlenberg	Dermatolog. Klinik	Herpes labialis	4. - 9. Passage
7. H ₅	Dermatolog. Klinik	Herpes labialis	5. - 9. Passage
8. H ₆	Dermatolog. Klinik	Herpes simplex der Wangenhaut	2. - 6. Passage
9. Gartner	eigenes Lab.	Stomatitis aphthosa herpetic.	1. - 12. Passage
10. MK	eigenes Lab.	Herpes labialis	1. - 6. Passage
11. Seyffert	eigenes Lab.	Herpes labialis	1. - 12. Passage
12. Ulbrich	eigenes Lab.	Herpes labialis	1. - 5. Passage

Tab. 2: Übersicht über die untersuchten Herpes-Virusstämme

B. CYTOPATHISCHER EFFEKT AUF DER HELA-ZELLKULTUR

1. CPE-Formen

Die Veränderungen in der Gewebekultur unter flüssigem Nährmedium, die nach Beimpfen der Kulturen mit den einzelnen Herpesstämmen auftraten, waren sehr unterschiedlicher Natur. Dabei konnten drei charakteristische Erscheinungsformen des CPE beobachtet werden. Sie lassen sich eindeutig voneinander abgrenzen. Im folgenden sind die Veränderungen in der Gewebekultur, wie sie in der vitalen, ungefärbten Flaschenkultur und in der gefärbten Objektträgerkultur auftreten, in ihren drei Erscheinungsformen beschrieben:

a) CPE-Form der Zellabrundungen

Im Verlaufe der cytopathischen Veränderungen tritt, beginnend etwa 6 Std. post infect., vollendet zwischen 24. und 36. Std. p.i., ein gleichmäßiges Abrunden aller Zellen auf. Sie erscheinen dabei scharf konturiert. Bis zur 72. Std. p.i. lösen sich alle Zellen von der Glaswand ab. Dieser Zustand wird als 'vollständiger CPE' bezeichnet.

b) CPE-Form mit kleinen Syncytien

Während der Entwicklung dieser CPE-Form bilden sich zwischen der 24. und 48. Std. p.i. neben einzelnen abgerundeten Zellen, wie sie für die erste Form charakteristisch gefunden wurden, zahlreiche vielkernige Syncytien. Dabei beträgt ihre Kernzahl jedoch nicht mehr als 20 bis 30 Kerne.

Im gefärbten Präparat erkennt man bei dieser CPE-Form, ebenfalls etwa 6 Std. p.i. beginnend, ein Verschwinden der spezifischen Kernstrukturen wie der Nucleoli und ein Zusammentreten der basophilen Substanzen an der Kernperipherie, die dadurch wallartig verdichtet erscheint; so entsteht die sog. 'Randchromatose'. Im Zentrum der Kerne bemerkt man einen homogen erscheinenden eosinophilen Bereich, der durch die Fixierung und Färbung geschrumpft und hofartig von der verdickten Membran getrennt zu sein scheint; er stellt das schon lange bekannte 'Einschlußkörperchen' dar (COWDRY, 8; CROUSE et al., 9; WILDY, 42). Das Cytoplasma der Zellen ist saumförmig um die Kerne zusammengezogen, die Plasmopodien sind verschwunden.

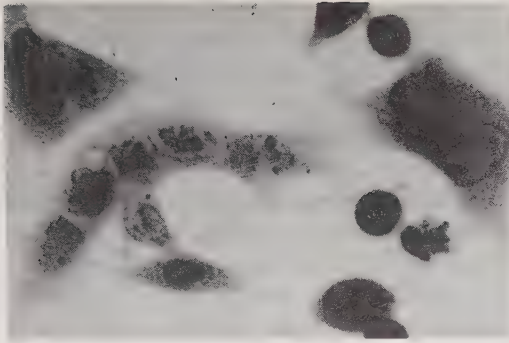


Abb. 1: Syncytium mit 'Einschlußkörperchen' und 'Randchromatose' bei Stamm Armstrong, Frühform.

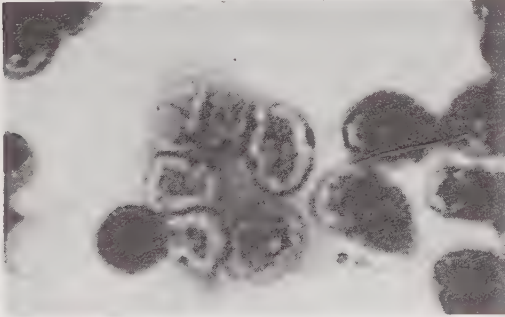


Abb. 2: Syncytium bei Stamm Armstrong, Spätform.

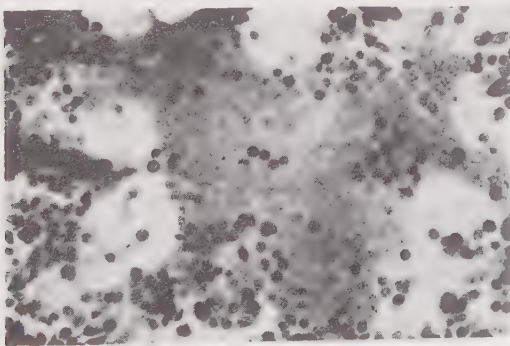


Abb. 3: Großflächiges Syncytium mit 'Randchromatose' bei Stamm Bergauer.

Die Gestalt der genannten Syncytien ist zu Beginn der cytopathischen Veränderungen breitflächig mit unregelmäßiger Konturierung und ungleichmäßiger Verteilung der Kerne. Im weiteren Verlauf runden sich die Syncytien ab und verlieren an Flächenausdehnung. Die Kerne lagern sich in den meisten Fällen in dichter Packung und unter Bildung von Ringformen aneinander und nehmen dabei polyedrische Formen an. Das anfangs hellbasophile Cytoplasma wird dichter. Etwa 24 Std. p.i. zeigen sich alle Zellen in der Kultur in einer der beschriebenen Weisen verändert.

c) CPE-Form der großflächigen Syncytien

Bei dieser Erscheinungsform des CPE fallen in der Gewebekultur großflächige Bezirke auf, in denen mikroskopisch keine Zellgrenzen mehr feststellbar sind. Sie enthalten eine nicht mehr übersehbare Anzahl von Kernen und treten in voller Ausbildung 19 bis 24 Std. p.i. auf. Im weiteren Verlauf des Prozesses lösen sich diese Zellbezirke ganzflächig von der Glasgefäßwand ab. Ein deutlicher, wenn auch nicht so ausgeprägter Cytoplasma-Flächenverlust ist auch an diesen Syncytien zu beobachten.

In den HE-gefärbten Präparaten dieser dritten CPE-Form ist ebenfalls eine ausgeprägte 'Randchromatose' feststellbar. Die oben erwähnten 'Einschlußkörperchen' sind jedoch nicht zu erkennen, wenngleich auch hier der zentrale Bereich des Kernes homogen erscheint.

2. Biologische Bedingungen der Syncytienbildung

a) Stammespezifität

Bei unseren Untersuchungen stellten wir fest, daß sich die Art eines CPE, die einmal bei einem bestimmten Virusstamm zur Beobachtung kam, im Verlauf der bei uns durchgeführten Passagen nicht veränderte.

b) Abhängigkeit von der Impfdosis

Um möglicherweise bestehende Abhängigkeiten der Syncytienentstehung von der angebotenen Virusmenge festzustellen, wurden Objektträgerkulturen von HeLa-Zellen mit Virusverdünnungen verschiedener Konzentrationen im Abstand von Zehnerpotenzen beimpft, inkubiert und nach HE-Färbung auf Riesenzellen untersucht. Die quantitative Auswertung ergab einen linearen Abfall der Syncytienzahl mit sinkender Viruskonzentration.

c) Abhängigkeit vom Bikarbonatgehalt des Nährmediums

Bei unseren Untersuchungen ergaben sich Zusammenhänge zwischen der NaHCO_3 -Konzentration im Medium und der Anzahl und Größe der gebildeten Syncytien.

Es wurden daher von drei typischen Vertretern der einzelnen CPE-Formen je drei Versuchsreihen angelegt. Dabei wurden alle Kulturen mit äquivalenten Virusmengen inkubiert; die zu vergleichenden Kulturgruppen beschickten wir mit Medium, dessen NaHCO_3 -Gehalt variiert wurde; er betrug 37,5 bzw. 75,0 bzw. 150,0 mg%. Der pH-Wert in diesen Kulturen schwankte zwischen 6,8 und 7,6.

Das Ergebnis dieser Versuche findet sich in Tab. 3 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß die Größe der gebildeten Syncytien mit vermehrtem Bikarbonatanteil und zunehmendem pH-Wert im Medium ansteigt, während ihre Anzahl sinkt. Zugleich konnte festgestellt werden, daß ein Virusstamm, der keine Syncytien bildet, Stamm Gartner, auch bei höherem oder niedrigerem Bikarbonatgehalt keine entsprechenden syncytialen cytopathischen Veränderungen auf der Gewebekultur hervorruft.

Gleichzeitig wurde die Virusproduktion der einzelnen CPE-Typen unter den Bedingungen variiert Bikarbonatkonzentrationen untersucht. Es wurde hierzu bei den eben genannten Versuchen das extrazelluläre Virus im zellfrei zentriugierten Nährmedium mit Hilfe der Plaque-Methode bestimmt. Die Titrationen ergaben (Tab. 4) ein gleichsinniges Verhalten der Vertreter der einzelnen CPE-Typen (Stamm Armstrong, Bergauer, Hofmeister, Gartner): Steigerung des Bikarbonatgehaltes im Medium um das Vierfache (37,5 bzw. 150,0 mg%) läßt den extrazellulären Virustiter um eine volle Zehnerpotenz sinken. Die Virusproduktion der Syncytien scheint demnach gleich derjenigen durch die Einzelzellen zu sein.

d) Abhängigkeit der Syncytienbildung vom Calciumgehalt des Mediums

Wir versuchten, durch Änderung des Calciumionen-Gehaltes im Medium einen Einfluß auf die Syncytienbildung zu nehmen: HeLa-Kulturen wurden 24 Std. vor Versuchsbeginn zur Äquilibrierung der ionalen Verhältnisse mit einem Nährmedium beschickt, das keine Calciumionen enthielt. Die dafür benutzte HANKSsche Lösung war calciumfrei angesetzt worden, der Serumzusatz erfolgte aus einem Vorrat gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung calciumfrei dialysierten Kälberserums. Nach verstrichenen 24 Std. entfernten wir das Me-

Stamm	NaHCO ₃ im Medium (mg%)		
	37,5	75,0	150,0
Armstrong	++++ kleine Syncyt.	++	+ große Syncyt.
Bergauer	++++ kleine Syncyt.	++	+ großflächige Syncytien
Gartner	-	-	-

Erkl.: ++++ massenhaft Syncytien
 ++ viele Syncytien
 + vereinzelte Syncytien
 - keine Syncytien

Tab. 3: Einfluß des Bikarbonats im Medium auf die Syncytienbildung verschiedener Stämme

Stamm	NaHCO ₃ im Medium (mg%)		
	37,5	75,0	150,0
Armstrong	$7,5 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^3$
Bergauer	$1,5 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$

(Titerangaben in pfu/ml)

Tab. 4: Extrazellulärer Virustiter bei verschiedenem Bikarbonat-gehalt des Mediums. Titration 36 Std. p. i.

dium, beimpften die Versuchs- und entsprechende Kontrollkulturen mit äquivalenten Virusmengen, fügten frisches, wiederum calciumfreies Medium hinzu und inkubierten.

Das Ergebnis zeigt Tab. 5. Dabei läßt sich eine ausgeprägte Begünstigung der Syncytienbildung durch die Gegenwart von Calciumionen im Medium feststellen. Auch Serumzusatz (calciumfrei) hat einen, wenn auch wesentlich schwächeren, gleichsinnigen Einfluß.

3. Untersuchungen über die Entstehungsweise der Syncytien

Im Rahmen unserer Arbeit ergab sich die Aufgabe, festzustellen, ob auch beim Herpes-simplex-Virus die Syncytien durch eine Fusion benachbarter Zellen entstehen oder sich durch alleinige Kernteilung bei fehlender totaler Zellteilung bilden. Dieser Vorgang war bisher beim Herpes-B-Virus (Herpes-simiae-Virus) von FALKE (13) beobachtet und nachgewiesen worden.

In drei Versuchsansätzen mit dem Stamm Armstrong und in einem Ansatz mit dem Stamm Bergauer verfolgten wir die Entwicklung der cytopathischen Veränderungen in der vitalen HeLa-Kultur (Vierkantflaschen). Dazu wurden die Kulturen nach ihrer Beimpfung, wobei die Viruskonzentration auf etwa 1-5 pfu je Zelle eingestellt war, im Brutraum bei 37°C auf einem in der Gewebekulturtechnik üblichen Chemikermikroskop (Leitz) montiert und fortlaufend beobachtet. In Abständen von 30 min. fertigten wir mikrophotographische Aufnahmen an.

Die mikroskopische Verfolgung der Virusaktion in den beimpften Kulturen zeigte in allen Versuchsreihen eine Entstehung der Syncytien durch Zellfusion. Nach unseren Beobachtungen liegt der Fusionsbeginn etwa in der 10. Std. p. i., vollendet ist die Riesenzell- bzw. Syncytienbildung ca. 14 Std. p. i. Der Prozeß der Zellfusion spielt sich also gegen Ende des Vermehrungszyklus ab. Dieser wird beim Herpes-simplex-Virus mit einer Dauer von 12 Std. angegeben (STOKER und NEWTON, 38). In den Abb. 4 bis 6 läßt sich der Vorgang an den Stämmen Armstrong und Bergauer verfolgen; beide zeigten übereinstimmendes Verhalten. Noch vor dem Auftreten der eigentlichen großflächigen Syncytien war dabei das Erscheinen kleinerer mehrkerniger Gebilde zu bemerken, wie das schon von KAPLAN und BEN PORAT (24) für das Virus der Pseudorabies berichtet worden war.

Medium	24 Std. p. i.	48 Std. p. i.
1. mit Ca^{++} und Serum	++++	++++
2. mit Ca^{++} ohne Serum	+++	+++
3. ohne Ca^{++} mit Serum	++	++
4. ohne Ca^{++} ohne Serum	+	+

Erkl.: ++++ massenhaft Syncytien
 +++ viele "
 ++ einige "
 + spärlich "
 Stamm Armstrong

Tab. 5: Beeinflussung der Syncytienbildung durch Gegenwart von Ca^{++} -Ionen und (calciumfreiem) Serum im Medium.

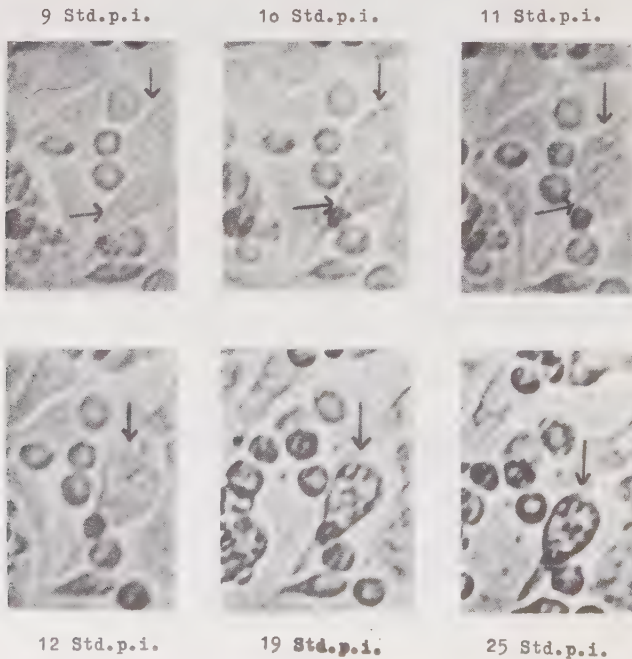


Abb. 4: Fusion zweier HeLa-Zellen nach Infektion mit Herpesvirusstamm Armstrong.

Um einen weiteren Beweis für die syncytiale Entstehungsweise der Riesenzellen zur Hand zu haben, wurden hochverdünnte HeLa-Zellsuspensionen so zur Aussaat gebracht, daß die Zellen nach Ablauf einiger Stunden im Einzelzustand an der Gefäßwand sesshaft wurden. Erfolgte nun eine Infektion mit dem riesenzellbildenden Stamm Bergauer, so waren im weiteren Verlauf des Versuches zwar alle typischen Zellalterationen im Sinne eines CPE wie Abrundung und Kerndegeneration festzustellen, es kam aber nicht zur Bildung vielkerniger Gebilde durch plasmodiale Kernteilungen.

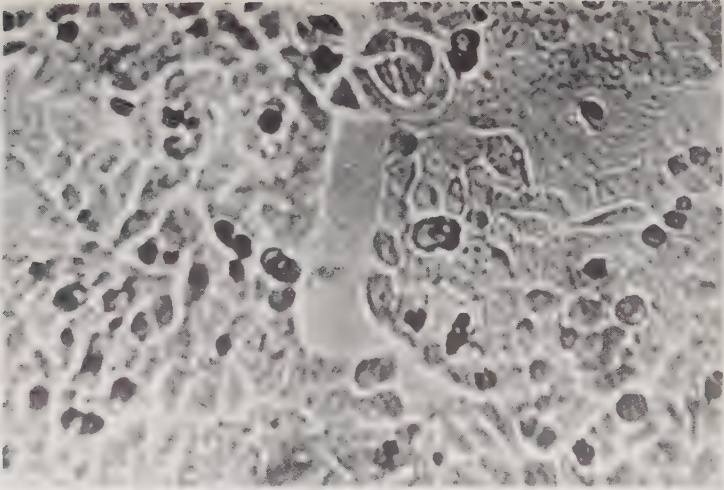


Abb. 5: Mit Herpes-Virusstamm Bergauer infizierter HeLa-Zellrasen vor der Zellfusion (12 Std. p. i.)

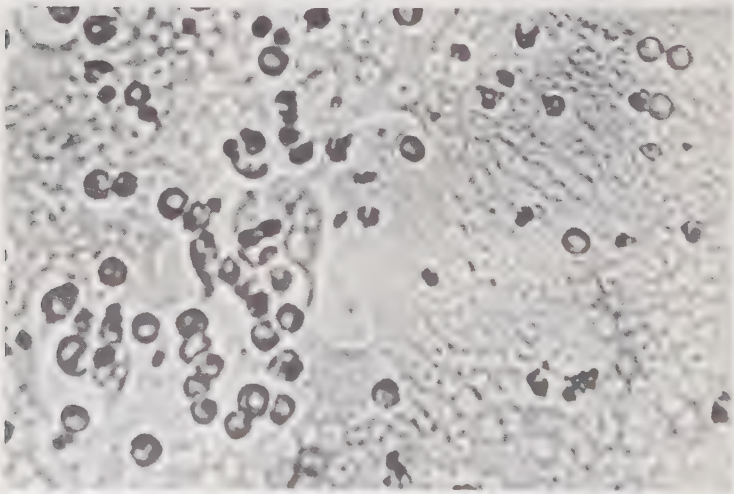


Abb. 6: Kultur der Abb. 5 nach der Zellfusion. Beachte besonders die großflächige Syncytienbildung im rechten Bildteil; die dunklen abgerundeten Zellen schwimmen einzeln über der eigentlichen Fusionsebene.

C. ANWENDUNG DER PLAQUE-TECHNIK AUF DAS SYSTEM HERPESVIRUS-HELA ZELLE

Die quantitativen Arbeiten im Rahmen unserer Untersuchungen ließen uns nach einer brauchbaren Titrationsmethode für das Herpesvirus suchen, wobei es mit besonderer Rücksicht auf exakte Vergleichsmöglichkeiten darauf ankam, die gleiche Wirtszelle wie in den übrigen Experimenten zu verwenden. Die Anwendung der Plaque-Technik nach DULBECCO und VOGT, die wir hierzu ins Auge faßten, auf unser System Herpes-simplex-Virus - HeLa-Zelle brachte methodische Schwierigkeiten mit sich. In diese Richtung gehende Versuche waren bisher nicht gelungen. FARNHAM erzielte wohl Plaques mit dem Herpesvirus auf HeLa-Zellen, verwendete aber nicht agarhaltiges, sondern flüssiges Nährmedium. Dadurch blieb diese Methode in ihrer quantitativen wie qualitativen Auswertung unzuverlässig. Anderen Autoren waren Plaques nur mit den meist schwer zu erhaltenden Primärzellkulturen gelungen, so z. B. mit primären Kulturen von Kaninchen-Nierenzellen, Hühnerembryo-Zellen oder Amnionzellen vom Menschen (COOPER, 6).

1. Vorversuche

Es stellte sich in anfänglichen Versuchen heraus, daß die Plaque-Methode beim Vorgehen nach der von DULBECCO angegebenen Originalvorschrift sowie nach der bei YOUNGNER beschriebenen Modifikation für Titrations von Enteroviren keine Resultate erbrachte. Es mußten daher in Vorversuchen die geeigneten Bedingungen gesucht werden.

a) Bestimmung der Virus-Adsorptionszeiten

Um durch vorzeitigen Abbruch der Inkubation, die der Agaraufbringung zwecks Adsorption des Virus an dem angebotenen Zellrasen vorausgeht, keine Verfälschung der Ergebnisse zu provozieren, wurde der Zeitpunkt der vollendeten Adsorption bestimmt. Bei anderen Virusarten (Poliovirus) genügen Adsorptionszeiten bis zur Dauer einer Stunde; diese erwiesen sich für das Herpesvirus als zu kurz. In Versuchsansätzen mit den Stämmen Armstrong und Bergauer bestimmten wir die Adsorptionsfrist, indem in wechselnden Zeitabständen nach der Impfung mit gleichen Infektionsdosen die Inocula entfernt, die Kulturen dreifach mit DULBECCO-Puffer zur Ausspülung noch nicht an den Zellen fixierter Viruspartikel gewaschen und endlich der Nähragar aufgebracht wurde. Nach

Zeit min. p. i.	pfu pro Flasche	Mittel	%
20	12, 15, 15	14	18
40	24, 25, 22	24	31
60	29, 37, 39	34	44
90	56, 54	55	70
120	60, 55, 67	60	76
180	76, 76	76	96
240	78, 80	79	100

Tab. 6: Adsorptionszeiten beim Stamm Armstrong

Zeit min. p. i.	pfu pro Flasche	Mittel	%
0	1, 3, 0, 0	1	2
10	10, 17, 9	12	18
20	15, 16, 19, 11	15	23
30	28, 26, 12	22	34
45	17, 20, 26, 33	24	37
60	42, 35	38	59
120	46, 49, 45, 66	51	80
150	49, 54, 50, 66	54	84
180	59, 66, 55, 44	56	87
240	56, 60, 65, 69	63	98
300	55, 65, 70, 67	64	100
360	50, 52, 80, 76	64	100

Tab. 7: Adsorptionszeiten beim Stamm Bergauer

entsprechender Inkubation erhielten wir durch Auszählen der entstandenen Plaques die Ergebnisse der Tab. 6 und 7. Daraus erhellt, daß bei Einhaltung einer Inkubationstemperatur von 37°C der Adsorptionszuwachs nach 3 bis 4 Stunden zum Stillstand kommt.

b) Penetrationsraten

Gleichfalls war das Verhalten der Penetration im Hinblick auf ihren zeitlichen Verlauf neben der Adsorption zu prüfen, da allein die Zahl derjenigen Partikel, die die Zellwand wirklich durchdringen, die endgültige Zahl der Infektionserfolge festlegt. Dazu wurden die nach wiederum variierten Adsorptionszeiten noch nicht in das Zellinnere eingedrungenen Virusteilchen durch Bindung an Antikörper des homologen Immunserums inaktiviert. Der Antikörpertiter des verwendeten Mäuse-Immunserums wurde durch Verdünnen mit DULBECCO-Puffer nach den Werten, die ein Plaque-Reduktionstest zur Bestimmung der Serumaktivität ergeben hatte (Tab. 1), so eingestellt, daß für den Infektionstiter eines gleichen Volumens Virussuspension eine Depression um zwei Zehnerpotenzen zu erwarten stand. Die beimpften und immunserumbehandelten Kulturen wurden nach einer entsprechenden Reaktionszeit nochmals der Waschprozedur unterworfen und dann mit Nähragar beschickt.

Die erhaltenen Ergebnisse (für Stamm Armstrong in Tab. 8) zeigen, daß Adsorption und Penetration etwa 3 Std. p. i. den gleichen Stand gewonnen haben.

c) Impfvolumen und Adsorptionsrate

Hinsichtlich sicherer Reproduzierbarkeit unserer Titrationsergebnisse interessierte weiter, in welchem Ausmaß die Verteilung einer gegebenen Anzahl infektionstüchtiger Teilchen auf verschiedene Volumina von Impfflüssigkeit die Zahl der Infektionsereignisse beeinflusst. Eine konstante Virusmenge suspendierten wir in Puffervolumina von 1,0 bzw. 3,0 bzw. 5,0 ml. Diesen Inocula wurde auf je einer Kultur die gleiche Adsorptionsfrist gewährt, nach deren Ablauf die Impfflüssigkeit abgezogen und Agar aufgebracht wurde.

Wie Tab. 9 zeigt, entspricht dem kleinsten Verdünnungsfaktor die höchste Trefferausbeute; das optimale Beimpfungsvolumen für die hier verwendeten Kulturgefäße lag bei 1,0 ml.

Zeit min. p. i.	Adsorption			Penetration		
	pfu pro Flasche	Mittel	%	pfu pro Flasche	Mittel	%
30	38, 45, 30	37	47	21, 17, 32, 29	25	32
60	50, 49, 57	52	65	34, 45, 42, 34	39	48
90	52, 56, 55	54	68	52, 49, 56, 50	52	64
120	59, 55, 60	58	73	59, 50, 62, 60	58	72
180	74, 78, 78	76	96	75, 71, 75, 74	74	92
240	78, 77, 82	79	100	78, 77, 76, 78	77	97
300	75, 82, 78	78	100	76, 80, 78, 78	78	100

Tab. 8: Adsorptions- und Penetrationsraten des Stammes Armstrong

d) Relation Partikelzahl - Trefferrate

Die beschriebene Abhängigkeit der Trefferrate von dem Quotienten aus Partikelzahl und Suspensionsvolumen legte ferner die Frage nahe, ob die Plaque-Ausbeute einer Zu- oder Abnahme der Partikelzahl bei konstant gehaltenem Impfvolumen gesetzmäßig folge.

Zur Prüfung dieses Zusammenhanges stellten wir Virus-Verdünnungsreihen der Stämme Armstrong und Hofmeister her, in denen sich die einzelnen Stufen in Abständen von Zweierpotenzen folgten. Je Verdünnungsschritt wurde eine Anzahl von Testkulturen beimpft und zur Titration gebracht. Aus den in Tab. 10 zusammengefaßten Ergebnissen verrät sich die streng lineare Abhängigkeit der Trefferrate von der relativen Viruskonzentration.

e) Abhängigkeit der Plaque-Bildung von Inkubationsdauer und -temperatur

Fortlaufende Beobachtung der Plaque-Entstehung in infizierten DULBECCO-Kulturen ergab, daß die Bildung mikroskopisch feststellbarer Plaques als umschriebener Nekroseherde im Zellrasen bereits 24 Std. p. i. einsetzt. Etwa 48 Std. p. i. erreichen diese Herde die Grenze makroskopischer Sichtbarkeit, nach ca. 72 Std. haben sie ihre endgültige Flächenausdehnung erreicht. Was ihre Zahl anbetrifft, so sieht man nach Ablauf der ersten 48 Std.

keinen Zuwachs mehr.

Als optimale Inkubationstemperatur für das Plaque-Verfahren bewährten sich uns 37°C ; senkt man sie auf 32°C , so bleiben die Plaques an Ausdehnung zurück, bei 25°C endlich bleibt auch die Aufnahme von Vitalfarbstoff (Neutralrot) aus.

f) Einfluß des Bikarbonatgehaltes auf die Plaquebildung

Bei den auf S. 13 angegebenen Versuchen hatten wir eine Abhängigkeit der Erscheinungsformen des CPE vom Bikarbonatgehalt des Mediums beschrieben. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, auch für die Plaque-Technik die geeignete NaHCO_3 -Menge zu bestimmen, die dem Nähragar zugesetzt werden sollte. Das mußte sich besonders auf die Virusstämme beziehen, die großflächige Syncytien bilden. Darum wurde der Stamm Bergauer hier herangezogen. Bei der Abstufung der Bikarbonatkonzentrationen hielten wir uns an die auf S. 13 angeführten Mengen. Wie aus Tab. 11 zu ersehen ist, ließen sich bei einem NaHCO_3 -Gehalt von 150 mg% entsprechend einer molaren Konzentration von $1,79 \cdot 10^{-2} \text{ m NaHCO}_3$ im Nähragar mit dem Stamm Bergauer die größten Plaque-Durchmesser erzielen.

g) Serumgehalt im Nähragar

Der Einfluß des Serumgehaltes auf die Plaque-Bildung war Gegenstand weiterer Prüfungen. Ihre Resultate zeigten (Tab. 12) für Serumkonzentrationen von 10% die größten Plaque-Durchmesser; geringere Serummengen von 2 bzw. 5% ergaben kleinere Werte, ebenso wie sehr hohe Konzentrationen von 20% depressiv auf Größe und Anzahl der Plaques wirkten.

h) Vitalfärbung

YOUNGNER hatte bei der Komposition des Nähragars den Zusatz von Neutralrot als Vitalfarbstoff zur Vorschrift gemacht, um die Plaques als Nekroseherde im Zellrasen - als Äquivalente der Aktion je eines infektionstüchtigen Virusteilchens - gegenüber der neutralrotphagocytierenden nicht infizierten Umgebung besser sichtbar zu machen.

Uns zeigte sich aber, daß die herpesinfizierten Zellen noch erhebliche Zeit nach stattgehabter Infektion für Neutralrot aufnahmefähig blieben, sodaß der eigentliche Zweck seiner Applikation verfehlt wurde. Außerdem fanden wir einen deutlich toxischen Einfluß des Neutralrots auf die phagocytierenden HeLa-Zellen, Erfahrungen, wie sie auch von anderer Seite durch ähn-

Volumen der Inocula (ml)	Infektionserfolge (pfu pro Flasche)	Mittel	%
1,0	44, 58, 53	52	100
3,0	46, 47, 49	47	92
5,0	35, 36, 36	36	69

Tab. 9: Impfvolumen und Adsorptionsrate, Stamm Armstrong

Verd. grad	Stamm Armstrong		Stamm Hofmeister	
	Infektionsereignisse (pfu/ml Impfgut)	Mittel	Infektionsereignisse (pfu/ml Impfgut)	Mittel
2 ⁰	102, 70, 75, 53, 82	76	42, 33, 61	45
2 ⁻¹	38, 52, 29, 19	34	11, 36, 23	23
2 ⁻²	11, 27, 21, 15, 35	21	21, 5, 14	13
2 ⁻³	13, 5, 5, 7, 21	10	4, 0, 6	4
2 ⁻⁴	1, 7, 8, 3	4		

Tab. 10: Relation Partikelzahl - Trefferrate

NaHCO ₃ (mg%)	Zahl der Plaques je Kultur	Mittlerer Durchmesser der Plaques (mm)
37,5	45,42	0,5 - 0,7
75,0	60,52	0,8 - 1,2
150,0	61,58	1,0 - 2,0

Tab. 11: Einfluß des Bikarbonatgehaltes im Nährmedium auf
Größe und Anzahl der Plaques, Stamm Bergauer.

Kälberserumgehalt (%)					
	0	2	5	10	20
<u>Stamm Armstrong</u>					
Plaquezahl	61,53	52,57	54,51	59,51	36,42
PlauegröÙe (mm)	0,3	0,5	0,5	1,0	0,7
<u>Stamm Bergauer</u>					
Plauezahl	10,16	13,15	9,13	11,11	10,6
PlauegröÙe (mm)	0,3	0,5	0,7	1,5 - 2,0	um 1,0

Tab. 12: Einfluß des Serumgehaltes im Nähragar auf
Größe und Anzahl der Plaques.

liche Beobachtungen bestätigt werden (DARNELL et al., 10; McN. SCOTT et al., 35; KLEIN und GOODGAL, 26; McCLAIN und HACKETT, 7).

So gingen wir dazu über, den Nähragar zunächst ohne Vitalfarbstoff anzusetzen. 72 Std. p. i. überschichteten wir die erste Agarschicht mit einer weiteren von gleichartig zusammengesetztem Nähragar, der zusätzlich Neutralrot in der Konzentration von 0,1 mg% enthielt. Auf diesem Wege kann man mit der späten Farbstoffapplikation den Vorzug einer Fütterung der Zellen verbinden, die wegen der ausgedehnten Versuchsdauer für die Lebensfähigkeit der Zellen notwendig ist. Die infizierten Zellen innerhalb der Plaques waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr phagocytosefähig, die toxische Wirkung des Farbstoffes konnte angesichts des nahen Versuchsendes vernachlässigt werden.

2. Plaqueteknik

Entsprechend den Ergebnissen der Vorversuche wurden die Plaque-Experimente in folgender Weise angesetzt:

HeLa-Zellkulturen, die in Pulverflaschen angezüchtet worden waren und einen geschlossenen Zellrasen aufwiesen, wurden eine halbe Stunde vor Versuchsansatz nach Abzug des Nährmediums mit DULBECCO-Puffer zur Gewährleistung gleichmäßiger pH-Einstellung beschickt. Nach dessen Entfernung brachten wir die entsprechenden Virusverdünnungen in einem Volumen von 1,0 ml auf die Kulturen. Nach Verstreichen einer Adsorptionsperiode von 4 Std. bei 37°C wurden die beimpften Kulturen mit je 6,0 ml agarhaltigen, neutralrotfreien Nährmediums überschichtet, dessen Temperatur 39°C nicht überschreiten durfte. Anschließend an das Erstarren des Agars wurden sie für 72 Std. bei 37°C gehalten. Nach Ablauf dieser Frist erfolgte das Auftragen einer zweiten Agarschicht vollständiger Zusammensetzung mit Neutralrotzusatz. Nun schloß sich wiederum eine Inkubationsperiode von 24 Std. bei 37°C an, dann wurden die Kulturen auf Zimmertemperatur gebracht und nochmals 24 Std. bis zur endgültigen Plaque-Auszählung stehengelassen.

D. PLAQUE-MORPHOLOGIE DER UNTERSUCHTEN HERPES-STÄMME

Unter den oben herausgestellten Bedingungen gelang es, mit dem Herpes-simplex-Virus in Modifikation der klassischen Methode von DULBECCO und VOGT Plaques unter starrem agarhaltigem Medium auf einem HeLa-Dauerzellstamm zu erhalten. Dabei erwies sich, daß diese Methode nicht nur quantitativ als Titrationsverfahren auszuwerten ist, sondern daß sich auch einige stammesspezifische Unterschiede in der Plaque-Morphologie erkennen lassen; die Plaques der hier untersuchten Virusstämmen zeigen in Größe und Form charakteristische Differenzen, die zur gegenseitigen Abgrenzung verwertbar sind.

Allgemein sind die herpesinduzierten Plaques verhältnismäßig klein; Plaque-Durchmesser von mehr als 2,0 mm konnten bei keinem Herpes-Virusstamm erzielt werden. Für die einzelnen Stämme zeigt Tab. 13 als Charakteristica die Werte der mittleren Plaque-Durchmesser.

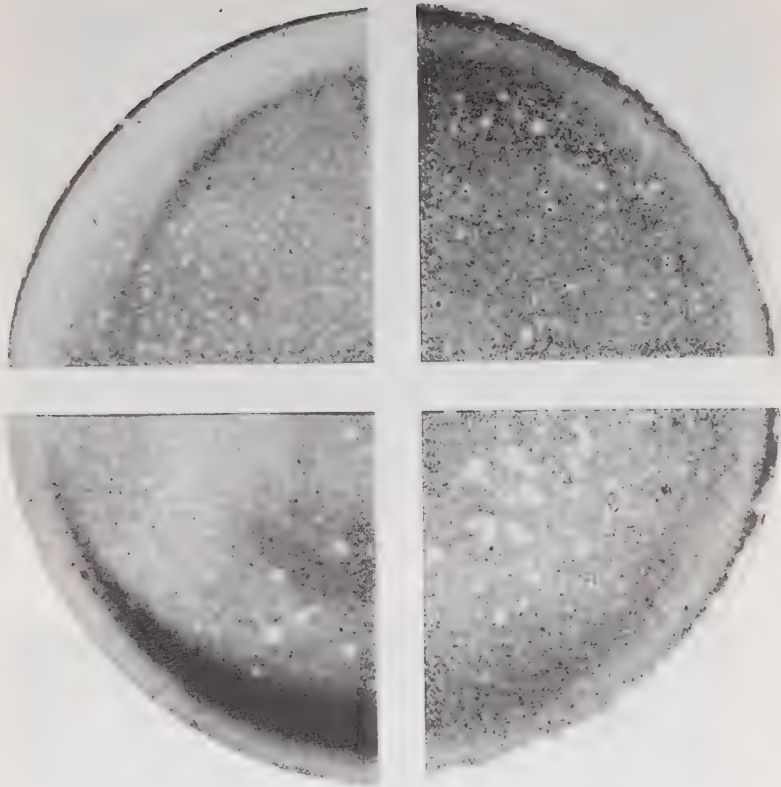
Die unterschiedlichen Formen der Plaques bei den einzelnen Virusstämmen, die in den Abb. 7 - 10 deutlich zu erkennen sind, werden durch das Vorhandensein oder Fehlen von Syncytien gekennzeichnet. Dabei lassen sich nur zwei Typen differenzieren:

Der eine Plaque-Typ wird von denjenigen Virusstämmen gebildet, die keine oder nur kleine Syncytien erzeugen (CPE-Formen a und b auf S. 10). Diese Plaques sind deutlich kleiner als die des anderen später beschriebenen Typs; ihre Begrenzung ist unscharf. Bei mikroskopischer Betrachtung bestehen die cytopathischen Veränderungen lediglich in einem Abrunden der Zellen, die keinen Vitalfarbstoff aufgenommen haben. Syncytien sind in diesen Plaques nicht zu erkennen (Typ Armstrong in Abb. 7 links oben).

Der andere bei den untersuchten Virusstämmen gefundene Plaquetyp weist gegenüber dem ersten einen größeren Durchmesser auf. Die Plaques zeigen allgemein eine scharfe Umgrenzung. Als besonderes Merkmal ist bei diesem Typ das häufige, teilweise makroskopisch sichtbare Vorhandensein von Syncytien zu erwähnen. Diese finden sich entweder zentral innerhalb der Plaques, wobei auffällt, daß sie teilweise sogar Vitalfarbstoff aufgenommen haben (Typ Stadelmann Abb. 7 rechts oben und Abb. 9), oder sie liegen an der Peripherie der Plaques und bilden damit deren Umgrenzung (Typ Hofmeister Abb. 10). Die Herpesvirusstämmen, die diesem zweiten Plaquetyp zugehören, sind die gleichen, die auch unter flüssigem Nährmedium durch die Bildung großflächiger Syncytien ausgezeichnet sind (CPE-Form c auf S. 12).

Herpes-Stamm	Mittlerer Plaque-Durchmesser (mm)	Syncytien in den Plaques
Armstrong	0,7 - 1,0	-
Gartner	0,7 - 1,0	-
Bergauer	1,5 - 2,0	+
Hofmeister	1,6 - 2,0	+
Stadelmann	1,2 - 1,6	+

Tab. 13: Plaque-Merkmale der untersuchten Herpesvirus-Stämme



Erkl.:	Armstrong	Stadelmann
	Bergauer	Hofmeister

(2fach natürliche Größe)

Abb. 7: Plaque-Morphologie der Herpesvirus-Stämme.
(Beachte die Syncytien innerhalb der Plaques
rechts oben, Stamm Stadelmann)

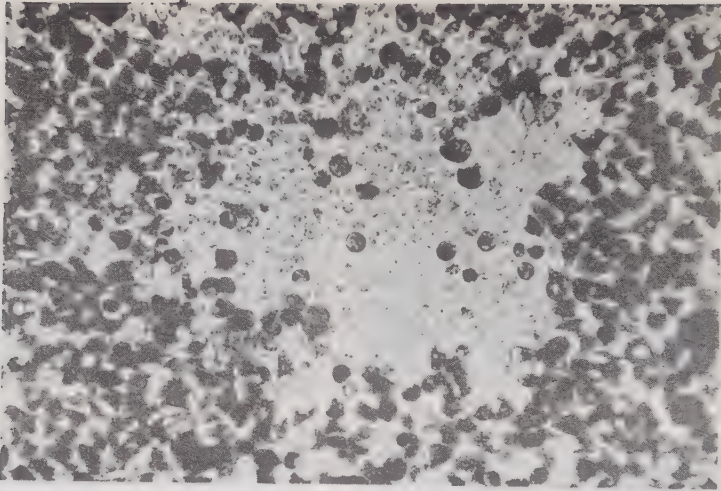


Abb. 8: Plaque-Gestalt bei Stamm Armstrong

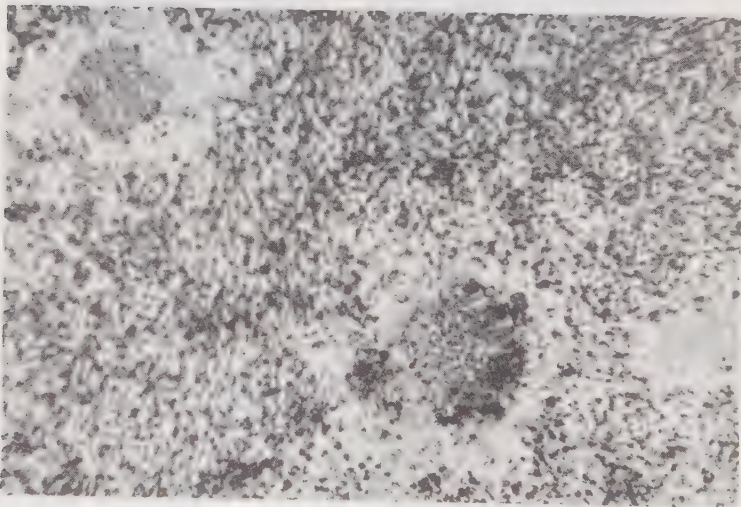


Abb. 9: Plaque-Gestalt bei Stamm Stadelmann,
Syncytien zentral gelegen.

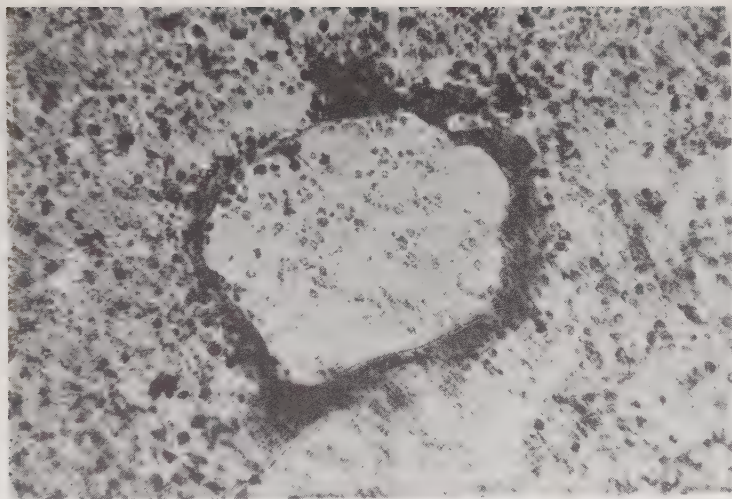


Abb. 10: Plaque-Gestalt bei Stamm Hofmeister,
Syncytien peripher gelegen.

DISKUSSION

Bei den an anderer Stelle (MUNK; McN. SCOTT) angegebenen stammesgebundenen Unterschieden im cytopathogenen Verhalten verschiedener Herpes-simplex-Stämme auf Zellkulturen handelte es sich vornehmlich um Auftreten oder Ausbleiben von Syncytien in den beimpften Kulturen. Auf der Suche nach einer Verbesserung der Differenzierungsmöglichkeiten für Herpesstämme gelang es uns, mit einer Modifikation der Plaque-Technik nach DULBECCO und VOGT auf HeLa-Zellkulturen herpesinduzierte Plaques zu erhalten, deren Stammeseigenheiten eine Typenzuordnung der untersuchten Stämme gestatten. Dieses Ergebnis erhält neben der Gewinnung einer zuverlässigen Titrationsmethode dadurch weitere Bedeutung, daß sich bisher noch keine Möglichkeiten fanden, beim Virus des Herpes simplex serologische Typendifferenzierungen von Stämmen unterschiedlicher genetischer Konstellationen (WILDY, 42; ROSS und ORLANDS, 32) vorzunehmen, wie kürzlich von SCHNEWEIS (34) betont wurde.

Die in dieser Arbeit dargestellten Erscheinungsformen der Herpes-Plaques zeigen in ihrer Morphologie Beziehungen zu den in der klassischen HeLa-Zellkultur beobachteten Formen des CPE verschiedener Herpesstämme. In beiden Fällen sind die Unterschiede von Stamm zu Stamm in der Hauptsache durch die verschiedenen cytopathischen Veränderungen, d. h. durch das Fehlen oder die Gegenwart von Syncytien gekennzeichnet.

Während sich in der klassischen Gewebekultur unter den hier behandelten Stämmen drei verschiedene Formen abzeichneten:

- (1) CPE mit Rundzellen,
- (2) CPE mit kleinen Syncytien,
- (3) CPE mit großflächigen Syncytien,

fanden wir mit der Plaque-Technik nur zwei morphologische Typen. Von diesen entsprach der eine den beiden zuerst genannten CPE-Formen (Rundzellen und kleine Syncytien), der zweite Plaquetyp korrespondierte mit der zuletzt genannten CPE-Form (großflächige Syncytien). Beim Vergleich dieser beiden Plaque-Formen ist bemerkenswert, daß Virusstämme, die zur großflächigen Syncytienbildung fähig sind, im Verhältnis zu den anderen die größeren Plaque-Durchmesser erreichen. Da die Größe einer Plaque als Anhalt für die Virusproduktion gilt und dadurch die Schnelligkeit der Verbreitung cytopathischer Veränderungen in der Gewebekultur festgelegt wird, liegt die An-

nahme nahe, daß sich die syncytienproduzierenden Stämme, möglicherweise per continuitatem von Zelle zu Zelle, schneller in der Kultur vermehren als die übrigen. Die Frage, ob dadurch auch die Zellfusion bedingt wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die für alle untersuchten Stämme gefundene relative Kleinheit der Plaques muß wohl auf die lange Latenzperiode innerhalb des Vermehrungszyklus beim Herpesvirus zurückgeführt werden. Außerdem ist das Herpesvirus hominis mit 1160 Å Durchmesser (MUNK und ACKERMANN, 29) eine verhältnismäßig große Struktureinheit, ein Umstand, der diffusionshemmend wirkt.

Bei der Beurteilung unserer Beobachtungen wäre die Frage zu diskutieren, ob bei der Gruppe der Herpes-simplex-Virusstämme grundsätzlich nur zwei biologisch differente Typen auftreten, wie sie nach der Plaque-Morphologie einzuteilen sind:

- (1) kleine Plaques unscharfer Begrenzung ohne Syncytien, und
- (2) größere Plaques scharfer Umgrenzung mit Syncytien, die bei einer Reihe von Stämmen in den Plaques zentral, bei anderen peripher gelegen sind.

Diese Differenzierung in zwei große Gruppen würde auch die von McN. SCOTT getroffene Einteilung der Herpesstämme nach ihrem CPE-Bild in der klassischen Gewebekultur reduzieren. Man gewinnt nämlich den Eindruck, daß bei den dort gemachten Beobachtungen der cytopathischen Veränderungen die in vorliegender Arbeit beschriebene Abhängigkeit der Syncytienbildung von verschiedenen Umweltfaktoren nicht genügend beachtet wurde. Das gilt in erster Linie für die von McN. SCOTT und Mitarbeitern angegebene Veränderung der CPE-Prägung im Verlauf der Passagen eines Stammes, denn die Konstanz der CPE- und Plaque-Formen wurde in dieser Arbeit besonders hervorgehoben.

Von der Konstanz der Stammeseigenheiten in der Aufeinanderfolge der Passagen abgesehen, widmeten wir noch anderen biologischen Bedingungen für die Syncytienentstehung unsere Aufmerksamkeit:

So wurde eine Begünstigung der Syncytiengröße durch hohen Bikarbonatgehalt des Nährmediums beobachtet, während die Virusproduktion durch die infizierten Zellen gerade umgekehrt bei niedrigem pH maximal ist.

Abhängigkeiten der Syncytienbildung von der angebotenen Viruskonzentration im Sinne einer Steigerung oder Minderung durch Mehrfachinfektion der betroffenen Zellen konnten experimentell ausgeschlossen werden. Die Relation der cytopathisch-syncytial veränderten Zellen zu den lediglich abgerundeten wird demnach von dem Ausmaß des Virusangebotes nicht betroffen.

Soweit den benutzten Virusstämmen Syncytienbildung zukommt, suchten wir den Zeitpunkt für deren frühestes Auftreten zu bestimmen, das bei 9 bis 14 Std. p. i. gefunden wurde (vgl. BARSKI und ROBINEAUX, 3). In die Diskussion zu ziehen ist in diesem Zusammenhang das Erscheinen kleinerer mehrkerniger Gebilde bereits wenige Stunden nach erfolgter Infektion und noch vor dem Auftreten der charakteristischen großen Syncytien. Bei McN. SCOTT findet sich ein Zitat von KAPLAN und BEN PORAT (24), das ähnliche Beobachtungen am Virus der Pseudorabies zum Gegenstand hat. Während für den Mechanismus dieses Phänomens der Vorgang der Plasmodienbildung durch amitotische Kernteilungen zur Erklärung in Anspruch genommen werden kann, muß man dies für den Entstehungsmodus der eigentlichen Syncytien zurückweisen. STOKER und NEWTON (38) weisen diesbezüglich auf das Schrumpfen des Quotienten aus Zell- und Kernzahl hin, dessen Beginn sie um die 10. Std. p. i. feststellen konnten. Dieser Zeitpunkt fällt mit unseren Beobachtungen über die ersten Zellfusionen zusammen, die wir in herpesinfizierten Kulturen machten. Hier sind Änderungen der Permeabilität der Zellmembranen als auslösendes Moment zu diskutieren (KAPLAN und VATTER, 25; BANG, 2). Zusammenhänge mit dem dargestellten Einfluß der Calciumgegenwart auf die Syncytienbildung sind wahrscheinlich.

Unter klinischen Aspekten scheint die Abgrenzung der Virusstämme mit großflächiger Syncytienbildung gegenüber denjenigen mit Bildung von Rundzellen und kleinen Syncytien noch besondere Bedeutung zu erhalten: vergleicht man die bei den hier beschriebenen Stämmen gesehenen CPE-Formen hinsichtlich der Syncytienbildung mit der klinischen Lokalisation der vesikulären Effloreszenzen (Tab. 14), von denen die Stämme isoliert wurden, so lassen sich dabei Beziehungen herstellen. Unter den bislang untersuchten Stämmen, die von Herpesbläschen im Bereich des Mundes und der Gesichtshaut isoliert wurden, befindet sich kein Stamm mit großflächiger Syncytienbildung. Demgegenüber sind die Stämme mit dieser Fähigkeit von selteneren, z. T. genitalen Lokalisationen gewonnen worden.

CPE mit Rundzellen und kleinen Syncytien		CPE mit großflächigen Syncytien	
Virusstamm	isoliert von	Virusstamm	isoliert von
Armstrong	CNS ⁺⁾	Bergauer	Herpes perianalis
Zacchari	Gingivostomatitis	Hofmeister	Herpes genitalis (intraurethralis)
Wohlenberg	Herpes labialis	Stadelmann	Eccema herpeticatum
H ₅	Herpes labialis		
H ₆	Herpes simplex der Wangenhaut		
Gartner	Stomatitis aphthosa		
MK	Herpes labialis		
Seyffert	Herpes labialis		
Ulbrich	Herpes labialis		

⁺⁾ Primäre Lokalisation nicht bekannt

Tab. 14: Vergleich zwischen CPE und klinischer Lokalisation

Neben der Anwendung der beschriebenen Abwandlung der Plaque-Technik zur Bestimmung der Plaque-Morphologie, wie sie aus den Verfahren von DULBECCO, YOUNGNER und KAPLAN entwickelt wurde, konnten wir sie als exakte Titrationsmethode für quantitative Versuche mit dem Herpesvirus einsetzen. Eine Vereinfachung gegenüber den Verfahren der genannten Autoren ergab sich aus der Verwendung geschlossener Kulturflaschen an Stelle der dort benutzten Petri-Schalen, sodaß auf CO_2 -Begasung und Feuchtigkeitssättigung des Brutraumes verzichtet werden konnte. Gegenüber dem von FARNHAM geübten Vorgehen zeichnet sich die hier vorgeschlagene Methode durch die Verwendung von Nähragar an Stelle des flüssigen Mediums aus, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bedeutend sicherer gestaltet. Unter den für einen optimalen Versuchsablauf ermittelten Bedingungen ist vor allem eine möglichst späte Applikation des benötigten Vitalfarbstoffes (Neutralrot) zu erwähnen, die wir bis zum Ende der Eklipse oder gar darüber hinaus verzögerten. In Übereinstimmung mit DARNELL (10) und anderen (McN. SCOTT et al.; GREEN und OPTON, 20) hatten wir eine zelltoxische Wirkung des Neutralrots festgestellt, von dem McN. SCOTT darüber hinaus auch einen mindernden Einfluß auf die Adsorptionsrate gesehen hatte.

Soll die Plaque-Technik als Titrationsmethode von Wert sein, so muß gewährleistet sein, daß die Summe der Plaques zur Anzahl der dem Zellrasen angebotenen infektiösen Viruspartikel im Verhältnis linearer Abhängigkeit steht. Dazu gehört die Erfüllung der Prämisse, daß das Äquivalent der plaquebildenden Einheit die Elementarpartikel des infektiösen Prinzips sei und weiter die Gewähr, daß keine Mehrfachinfektion an einem Zellindividuum vonstattengehe. Fig. 1 liefert die experimentelle Bestätigung für die direkte Entsprechung der relativen Viruskonzentration gegenüber der Plaque-Ausbeute, wie sie sich bei DULBECCO unter Zuhilfenahme der POISSONSchen Verteilungsgesetze formuliert findet.

Weiter muß man Sicherheit dafür fordern, daß für jedes infektiöse Teilchen ein Infektionserfolg, also Plaquebildung, eintritt. Bei sonst definierten Bedingungen ist dabei vor allem die Größe des Impfvolumens in ihrem Verhältnis zur Zahl der darin suspendierten Virusteilchen ausschlaggebend. Treffertheoretische Überlegungen legen nahe, daß die Infektionswahrscheinlichkeit mit dem Quotienten aus Partikelzahl und der ihr exponierten Zellzahl wächst, wenn eine konstante Ausdehnung des virusempfindlichen Zellbereiches zugrunde gelegt wird. So konnte die Adsorptionsquote (Treffer-

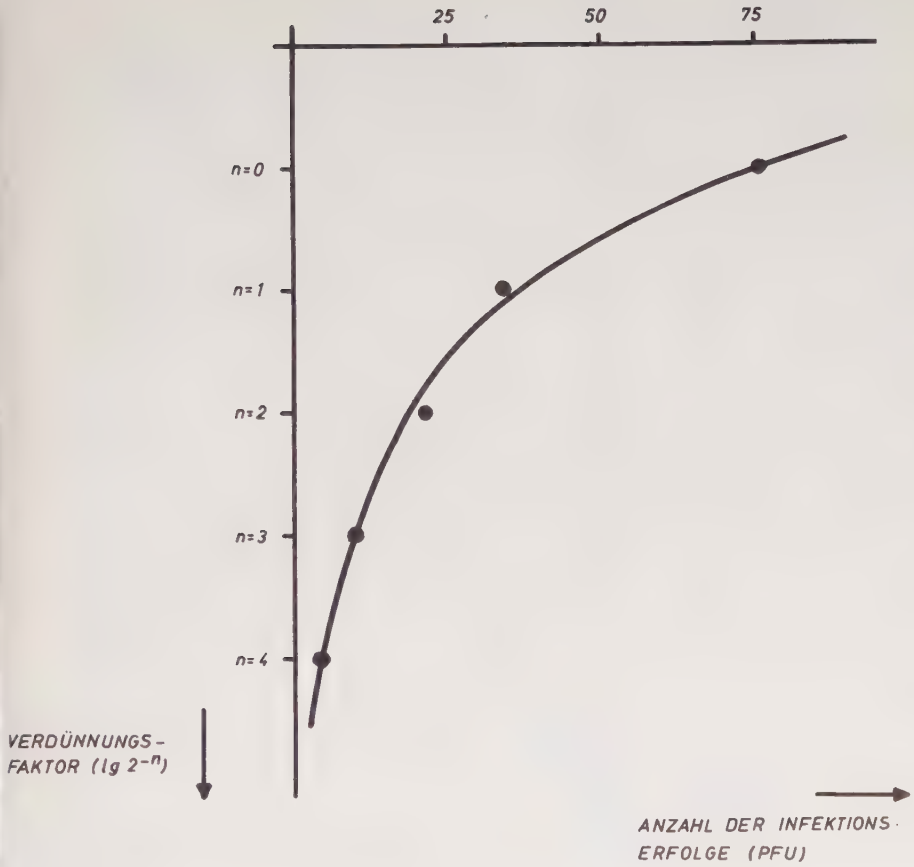


Fig. 1a: Anwachsen der Trefferrate mit der Partikelzahl bei konstantem Beimpfungsvolumen.

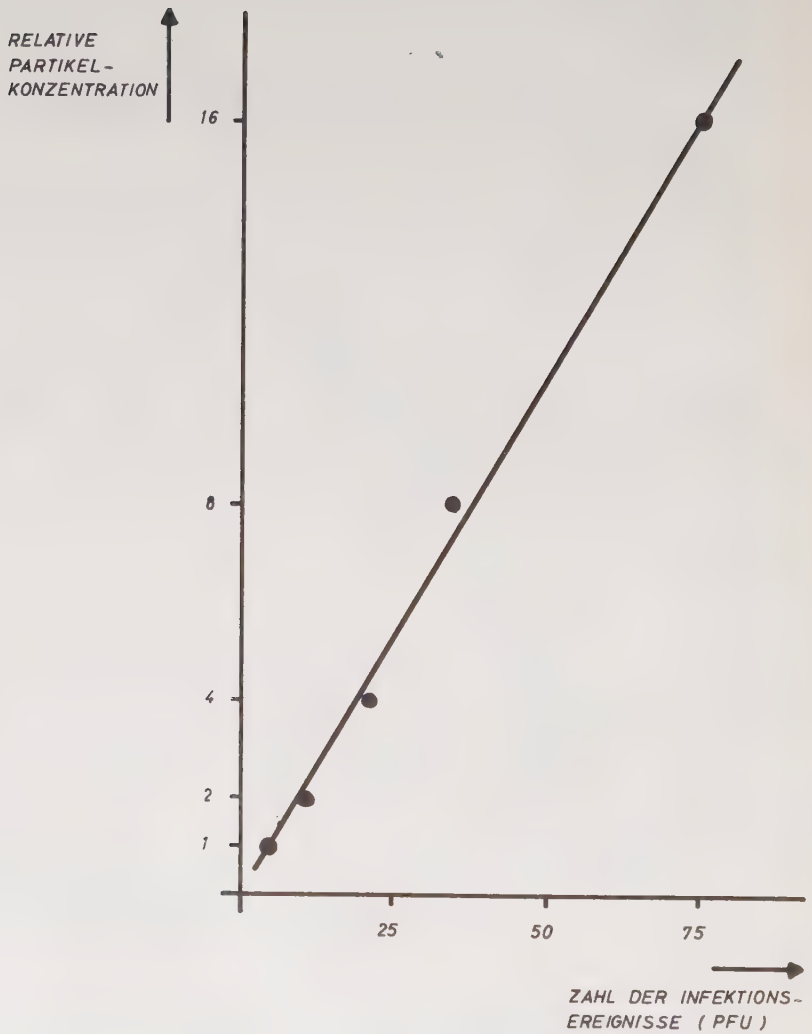


Fig. 1b: Lineares Anwachsen der Zahl der Infektionserfolge mit der Partikelzahl bei gleichen Volumina der Inocula.

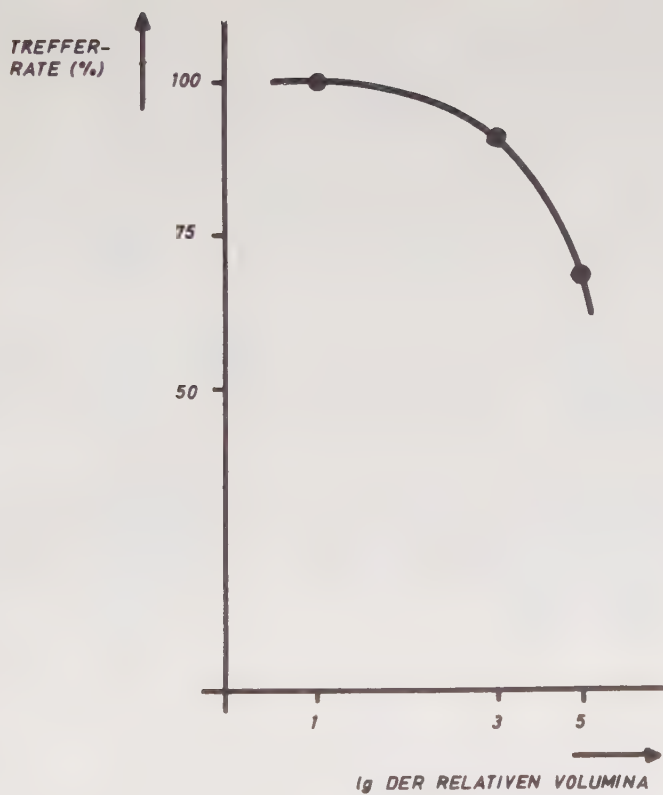


Fig. 2: Abhängigkeit der Trefferrate vom Volumen des Inoculum bei konstanter Partikelzahl. Die Volumina verhielten sich wie 1 : 3 : 5.

rate) durch Unterbringung der Infektionsdosis in möglichst kleinen Impfvolumina erheblich verbessert werden, wie entsprechende Versuche ergaben (Fig. 2).

In diesem Zusammenhang verdient der Zeitpunkt der vollendeten Virusadsorption noch besondere Beachtung. Wir fanden eine Rate 50%iger Adsorption nach 60 min.; nach Ablauf von drei Stunden war mit keiner wesentlichen Verbesserung der Plaque-Ausbeute mehr zu rechnen (Fig. 3). Diese Ergebnisse für die Halbwertszeiten der Adsorption stehen in gutem Einklang mit denen von FARNHAM für den Herpesstamm HFEM auf HeLa-Zellen. McN. SCOTT berichtet für seine Stämme P und GC auf Kaninchennieren-Zellen etwas höhere Adsorptionsraten, KAPLAN erwähnt etwas niedrigere Werte. Für die vollendete Adsorption geben alle Autoren übereinstimmend das Ende der 3. Std. p. i. an.

Ergänzend lehrt ein Vergleich der Kurvengestalt für Adsorption und Penetration von Herpesvirus auf HeLa-Zellen, daß die Penetration der Adsorption anfänglich ein wenig nachschleppt, ihr gegen Ende der 2. Std. p. i. aber rasch entgegensteilt, um sie schließlich nach etwa 3 Std. zu erreichen (Fig. 4).

Neben der Berücksichtigung der dargestellten Faktoren führte uns die Untersuchung einer Reihe von weiteren Umweltfaktoren wie Inkubationsdauer und -temperatur und Nährgarkomposition zur Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen für die Anwendung der Plaque-Technik als Titrationsmethode für das Herpesvirus auf HeLa-Zellen.

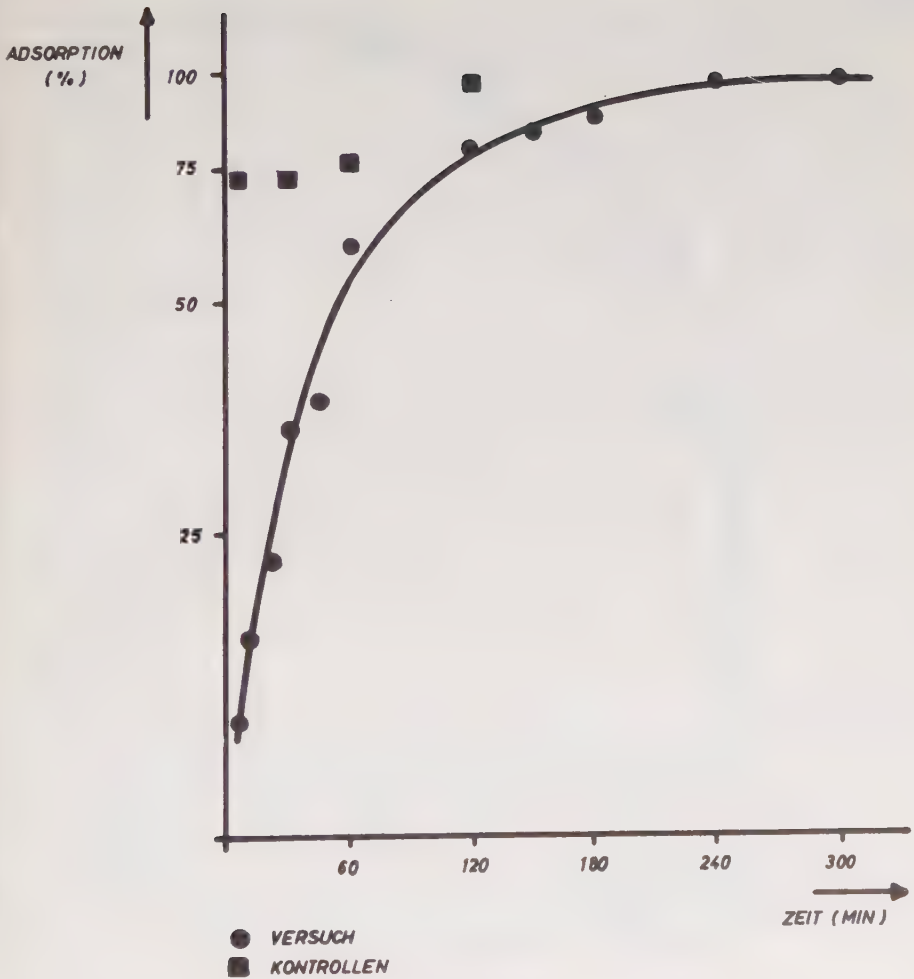


Fig 3: Adsorptionsraten des Stammes Bergauer in zeitlicher Abhängigkeit.

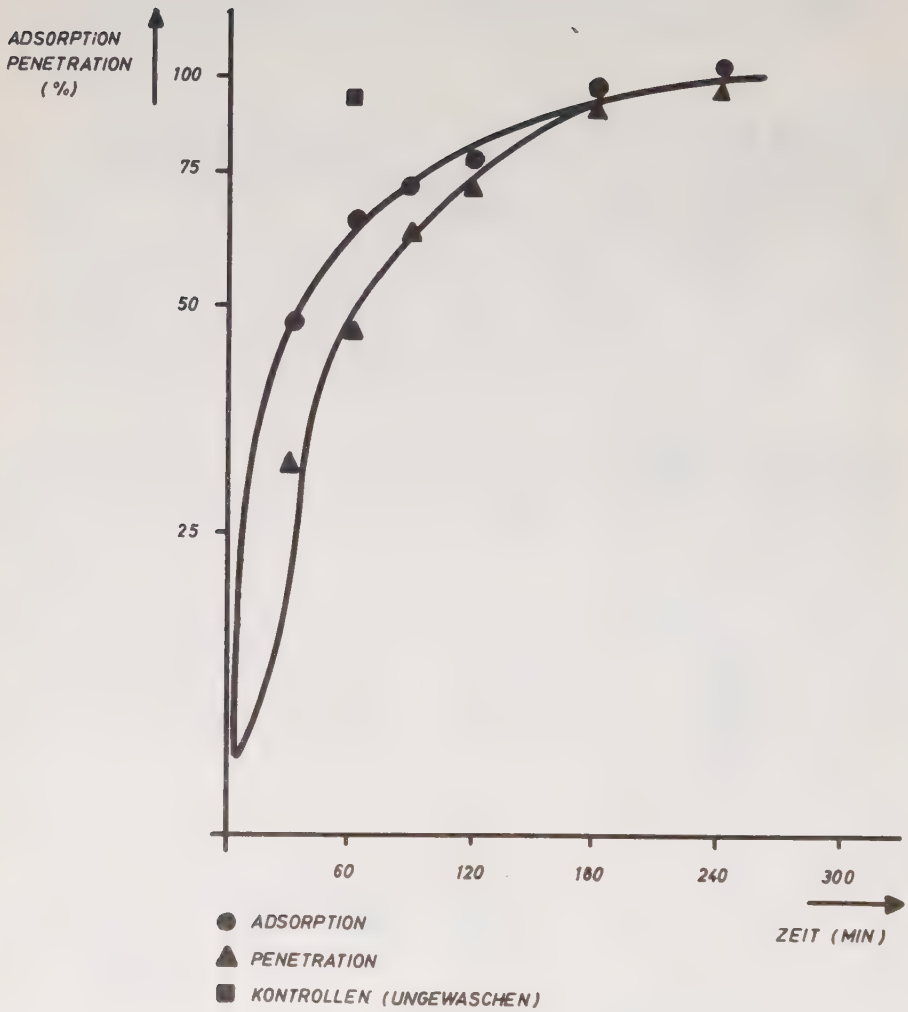


Fig. 4: Vergleich der Adsorptions- und Penetrationsraten des Stammes Armstrong.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das unterschiedliche cytopathogene Verhalten einiger, zum Teil frisch isolierter Stämme des Herpes-simplex-Virus (*Herpesvirus hominis*) auf der HeLa-Zellkultur dargestellt. Ferner wurden die experimentellen Bedingungen untersucht, die die Ausprägung der verschiedenen cytopathischen Zellveränderungen beeinflussen können. Die Untersuchungen erfolgten teils nach der üblichen Gewebekulturmethode, teils nach einer hier für das Herpesvirus abgewandelten Plaque-Technik. Diese wurde auf ihren Wert als Titrationsmethode geprüft und diente darüber hinaus zu dem Versuch, eine Typendifferenzierung des Herpesvirus auf Grund der Plaque-Morphologie zu erreichen.

Es konnten unter 12 untersuchten Virusstämmen auf Grund des differenten cytopathogenen Verhaltens auf der HeLa-Zellkultur unter flüssigem Nährmedium drei verschiedene Erscheinungsformen des cytopathischen Effektes (CPE) herausgestellt werden. Diese äußern sich in:

- (1) Zellabrundungen,
- (2) Zellabrundungen und Bildung kleinflächiger Syncytien,
- (3) Bildung großflächiger Syncytien.

Demgegenüber stellen sich in der Plaque-Morphologie nur zwei unterscheidbare Formen dar:

- (1) Es zeigten sich zum ersten kleine (Durchmesser 0,7 - 1,0 mm), unregelmäßig begrenzte Plaques ohne Syncytien. Diese wurden von den Herpesstämmen gebildet, deren CPE unter flüssigem Medium durch Abrunden oder Bildung lediglich kleiner Syncytien gekennzeichnet ist.
- (2) Der andere Plaque-Typ hat größere Ausdehnung (Durchmesser 1,6 bzw. 2,0 mm) und weist entweder zentral gelegen oder an der Peripherie großflächige Syncytien auf. Diese Plaques besitzen dadurch einen scharfen Rand. Sie charakterisieren diejenigen Herpesstämmen, die auf der klassischen Gewebekultur großflächige Syncytien hervorrufen.

Die Bedingungen, von denen die verschiedenen CPE-Formen und die Syncytienbildung abhängig sind, konnten in zahlreichen Versuchsreihen bestimmt werden:

- a) Die Form des CPE, die bei einem Virusstamm festgestellt wurde, ist für diesen spezifisch. Sie zeigt im Laufe wiederholter Passagen keine Ände-

rungen.

- b) Die Syncytienbildung steht in einfacher linearer Abhängigkeit von der Impfdosis.
 - c) Hoher Bikarbonatgehalt im Nährmedium steigert die Syncytienbildung.
 - d) Gegenwart von Calciumionen im Medium fördert die Syncytienbildung.
- Die hier genannten Bedingungen gelten für Stämme mit kleinflächigen ebenso wie für die mit großflächigen Syncytien.

Weiter wird für den Entstehungsmodus der Syncytien der Vorgang der Zellfusion mikrophotographisch dargestellt.

Es wird auf die Beobachtung aufmerksam gemacht, daß die syncytienbildenden Herpesstämme von selteneren klinischen Herpeslokalisationen isoliert wurden. Demgegenüber weist keiner der bisher von banalen Herpes-labialis-Effloreszenzen gewonnenen Virusstämme großflächige Syncytien auf.

Als Titrationsmethode für quantitatives Arbeiten mit dem Herpesvirus wird eine Modifikation der Plaque-Technik nach DULBECCO beschrieben. Die Bedingungen für bestmögliche Reproduzierbarkeit der Titrationsergebnisse werden gesucht und für die Anwendung der Technik als Routineverfahren ausgewertet.

Da beim Herpes-simplex-Virus eine Typisierung mit serologischen Methoden noch nicht zu erreichen ist, wird eine Typendifferenzierung auf Grund des angeführten stammesspezifischen cytopathogenen Verhaltens auf der HeLa-Gewebekultur und besonders mit Hilfe der Plaque-Morphologie vorgeschlagen.

LITERATUR

1. ARMSTRONG, C.: Pub. Health. Rep. 58, 16 (1943)
2. BANG, F.: Lab. Invest. 8, 557 (1959)
3. BARSKI, G., and ROBINEAUX:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101, 632 (1959)
4. BLACK, F. L., and J. L. MELNICK:
J. Immunol. 74, 236 (1955)
5. CHU, L. W., and G. H. WARREN:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105, 396 (1960)
6. COOPER, P. D.: Advanc. Virus Research 8, 319 (1961)
7. McCLAIN, M. E., and A. J. HACKETT:
J. Immunol. 80, 356 (1958)
8. COWDRY, E. V.: Arch. Path. 18, 114 (1934)
9. CROUSE, H. V., L. L. CORRIELL, H. BLANK and T. F. McNAIR SCOTT:
J. Immunol. 65, 119 (1950)
10. DARNELL, J. E., R. A. COCKART and K. T. SAWYER:
Virology 6, 567 (1958)
11. DULBECCO, R.: Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 38, 747 (1952)
12. DULBECCO, R., and M. VOGT:
J. Exper. Med. 99, 167 (1954)
13. FALKE, D., und J. E. RICHTER:
Arch. Virusforschung 11, 73 u. 86 (1961)
14. FARNHAM, A. E.: Virology 6, 317 (1958)
15. FARNHAM, A. E., and A. A. NEWTON:
Virology 7, 449 (1959)
16. GAJDUSECK, D. C., et al.:
J. A. M. A. 149, 235 (1952)

17. GEY, G.O.: in:
PARKER, R.C.: Methods of Tissue Culture
2nd.Ed., p.81 (New York
1950):
Bull. Tissue Culture Assoc. March 16
18. GEY, G.O., W.D. COFFMAN and M.T. KUBICEK:
Cancer Research 12, 264 (1952)
19. GRAY, A., T. TOKUMARU und T.F. McN. SCOTT:
Archiv Virusforschung 8, 59 (1958)
20. GREEN, R.H., and E.M. OPTON:
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 102, 519 (1959)
21. HSIUNG, G.D., and J.L. MELNICK:
Virology 1, 533 (1955)
22. HSIUNG, G.D., and J.L. MELNICK:
J. Immunol. 80, 282 (1958)
23. KAPLAN, A.S.: Virology 6, 317 (1957)
24. KAPLAN, A.S., and BEN PORAT:
Virology 8, 352 (1959)
25. KAPLAN, A.S., and A.E. VATTER:
Virology 7, 394 (1959)
26. KLEIN, S.W., and S.H. GOODGAL:
Science 130, 629 (1959)
27. MELNICK, J.L., and E.M. OPTON:
Bull. World Health Org. 14, 129 (1956)
28. MUNK, K.: Nova Acta Leopoldina 19/134, 148 (1957)
29. MUNK, K., and W.W. ACKERMANN:
J. Immunol. 71, 426 (1953)

30. NADEJE, T., I. TAMM and I.R. OVERMAN:
J. Lab. Clin. Med. 46, 648 (1955)
31. ROIZMAN, B., and P.R. ROANE:
Virology 15, 75 (1961)
32. ROSS, R.W., and E. ORLANS:
J. Bacteriol. Pathol. 76, 393 (1958)
33. SCHERER, W.F., and J.T. SYVERTON:
Am. J. Pathol. 30, 1057 (1957)
34. SCHNEWEIS, K.E., und H. BRANDIS:
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 183, 556 (1961)
35. SCOTT, T.F. McNAIR, D.L. McLEOD and T. TOKUMARU:
J. Immunol. 86, 1 (1961)
36. SCOTT, T.F. McNAIR: in:
Diagnostic Procedures for Viral and
Rickettsial Diseases, 2nd Ed., pp. 313-340
(New York 1956)
37. STOKER, M.G.P.: Brit. Med. J. i, 963 (1957)
38. STOKER, M.G.P., and A.A. NEWTON:
Virology 7, 438 (1959)
39. THOMPSON, R.L., and M.S. COATES:
J. Infect. Deseas. 71, 83 (1942)
40. THOMSEN, R., R. HAAS, V. DOSTAL und E. RUSCHMANN:
Z. Hygiene 146, 114 (1959)
41. WHEELER, C.E.: J. Immunol. 81, 98 (1958)
42. WILDY, P.: Gen. Microbiol. 13, 346 (1955)
43. YOUNGNER, J.S.: J. Immunol. 76, 288 (1955)

LEBENS LAUF

Der Verfasser dieser Arbeit, Hans-Joachim Dieter DONNER, kam als Sohn des Studienrates Dr. phil. Fritz DONNER und der Tanz- und Gymnastiklehrerin Erika DONNER, geb. KIMSTEDT, am 29. Dezember 1936 in Leipzig zur Welt. Er begann in seiner Geburtsstadt den Volksschulbesuch, den er an der Grundschule in Radebeul abschloß. 1951 trat er in das Gymnasium zum Heiligen Kreuz in Dresden ein und legte dort 1955 die Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr bezog er die Universität zu Leipzig zum Studium der Medizin, wo er 1956 das Vorphysikum bestand. 1957 zwangen ihn politische Umstände zur Flucht aus der DDR. In München konnte er seine unterbrochene Ausbildung fortsetzen und 1958 das Physikum ablegen, um die klinischen Studien zu beginnen. Im Juli 1962 schloß er das medizinische Staatsexamen in München ab.

Die Jahre 1960/61 widmete der Verfasser im Viruslabor der Friedrich BAUR-Stiftung bei der II. Medizinischen Universitätsklinik in München mit Unterstützung der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Kinderlähmung e.V. Arbeiten über das Poliomyelitis- und das Herpes-simplex-Virus. Die vorliegende Arbeit entstand in dieser Zeit unter der Anleitung von Privatdozent Dr. K. MUNK.

